



BIOPHEN™ DiXal

Ref 221030

R1 R2 3 x 2,5 ml, R3 4 x 20 ml

Chromogenní test pro stanovení přímých inhibitorů Faktoru Xa (DiXals)



www.hyphen-biomed.com

155, rue d'Eragny
95000 NEUVILLE SUR OISE
FRANCE
Tel. : +33 (0)1 34 40 65 10
Fax : +33 (0)1 34 48 72 36
info@hyphen-biomed.com

Revize: 05_2025, verze 9

POUŽITÍ:

BIOPHEN™ DiXal souprava je chromogenní anti-Xa test pro In Vitro kvantitativní stanovení přímých inhibitorů faktoru Xa (DiXals), jako je Rivaroxaban, Apixaban nebo Edoxaban, v lidské citrátové plazmě (nebo v čištěném roztoku) za použití manuální nebo automatizované metody. Tato metoda není určena pro nepřímé inhibitory FXa, jak jsou např. Fondaparinux nebo hepariny.

SOUHRN:

Technický:

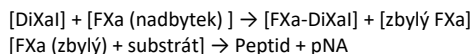
BIOPHEN™ DiXal souprava je určena pro dvou-krokovou chromogenní metodu specifickou pro přímé inhibitory FXa. Metoda není citlivá na hepariny (UFH a LMWH).

Klinický:

Měření koncentrace přímého inhibitoru FXa může být užitečné v některých klinických situacích u nemocných léčených přímými inhibitory FXa – např. při akutní chirurgii, v situacích s rizikem krvácení, při nehodách, u pacientů s trombotickými a krvácivými potížemi nebo při podezření na předávkování¹⁻⁴.

PRINCIP STANOVENÍ:

BIOPHEN™ DiXal je chromogenní metoda založená na inhibici konstantního a v nadbytku přidaného množství faktoru Xa (FXa) testovaným DiXal a hydrolyzou na FXa specifického chromogenního substrátu zbylým FXa. Uvolní se pNA a jeho množství je přímo úměrné aktivitě zbylého FXa. Je zde tedy nepřímá závislost mezi koncentrací DiXal v testovaném vzorku a intenzitou zbarvení odpovídajícího množství uvolněného pNA. Změna zbarvení se měří při vlnové délce 405 nm.



REAGENCIE:

R1 Reagent 1: FXa (h): Čištěný lidský FXa, lyofilizovaný v přítomnosti stabilizátorů, Tris a BSA.

3 x 2,5 ml lahvičky

R2 Reagent 2: Substrát: FXa specifický substrát (CS-11(65)) lyofilizovaný.

3 x 2,5 ml lahvičky

R3 Reagent 3: Pufr: Tris-NaCl-EDTA reakční pufr s pH 7,85, obsahuje 1% PEG a azid sodný (0,9 g/l) jako konzervační přísadu. Obsahuje látku neutralizující heparin.

4 x 20 ml lahvičky

Koncentrace Faktoru Xa je nastavena pro každou šarži reagensů, aby se dosáhlo optimální reaktivity a linearit pro měření.

UPOZORNĚNÍ

- Některé reagensy v soupravě obsahují materiál lidského a zvířecího původu. Plazma použitá k výrobě takového materiálu byla testována registrovanými metodami a shledána negativní na přítomnost protilátek HIV 1, HIV 2 a HCV a antigenu Hepatitidy B. Přesto žádná metoda testování nemůže kompletně vyloučit přítomnost infekčních agens. Proto musí být tyto reagensy považovány za potenciálně infekční se všemi odpovídajícími bezpečnostními opatřeními.
- Azid sodný může reagovat s oloveným a měděným potrubím za vzniku vysoce explozivních azidů kovů.
- Odpadní materiál zlikvidujte dle lokálních směrnic o zacházení s odpadem.
- Používejte pouze reagensy ze souprav o stejné šarži.
- Studie stability prokázaly, že reagensy může být přepravována za pokojové teploty po krátký čas bez jejího poškození.
- Pouze pro použití In Vitro.

PŘÍPRAVA REAGENCIÍ:

Reagensy jsou lyofilizovány pod vakuem v jejich lahvičkách. Vyvarujte se ztráty lyofilizátu při otevírání lahvičky.

R1 R2 Rozpusťte obsah každé lahvičky **přesně s 2,5 ml destilované vody**. Dobře promíchejte, dokud se produkt úplně nerozpustí. Zamezte tvorbě pěny a ihned po zamíchání reagensů vložte do analyzátoru podle instrukcí přístroje.

Pro manuální metodu měření nechte reagensy stabilizovat 30 minut při pokojové teplotě (18-25°C), homogenizujte před použitím.

R3 Připraven k použití. Před použitím nechte stabilizovat po dobu 30 minut za pokojové teploty (18-25°C), promíchejte před každým použitím.

SKLADOVÁNÍ:

Reagensy musí být skladovány při 2-8°C ve svém originálním obalu. Je pak stabilní do data expirace uvedeného na krabičce.

R1 Stabilita rozpuštěné reagensy, pokud je zabráněno kontaminaci nebo vysychání a pokud je uchovávána v uzavřené lahvičce, je:

- 15 dní při teplotě 2-8°C
- 7 dní při pokojové teplotě (18-25°C)
- 2 měsíce zamrazená při teplotě -20°C nebo nižší*
- Stabilita v analyzátoru: viz specifická aplikace.

R2 Stabilita rozpuštěné reagensy, pokud je zabráněno kontaminaci nebo vysychání a pokud je uchovávána v uzavřené lahvičce, je:

- 2 měsíce při teplotě 2-8°C
- 7 dní při pokojové teplotě (18-25°C)
- 2 měsíce zamrazená při teplotě -20°C nebo nižší*
- Stabilita v analyzátoru: viz specifická aplikace.

R3 Stabilita reagensy po otevření, chráněné před kontaminací a odpařováním, uzavřené, je:

- 2 měsíce při teplotě 2-8°C
- 7 dní při pokojové teplotě (18-25°C)
- Stabilita v analyzátoru: viz specifická aplikace.

*Rozmrazujte pouze jednou, co nejrychleji, při 37°C a ihned použijte.

Žluté zbarvení značí kontaminaci substrátu. Reagensy znehodnoťte a načnete novou lahvičku.

REAGENCIE A MATERIÁL POTŘEBNÝ, ALE V KITU NEOBSAŽENÝ:

Reagensy:

- Destilovaná voda.
- Kyselina octová (20%) nebo kyselina citronová (2%) pro end point metodu.
- Kalibrační plazma s určenou hladinou testovaného DiXal, například:

Kalibrátor	BIOPHEN™ Apixaban Calibrator / Low	BIOPHEN™ Rivaroxaban Calibrato / Low	BIOPHEN™ Edoxaban Calibrator / Low
Kat. číslo	226201 / 226101	222701 / 226001	226501 / 226401
Kontroly	BIOPHEN™ Apixaban Control / Low	BIOPHEN™ Rivaroxaban Control / Low	BIOPHEN™ Edoxaban Control / Low
Kat. číslo	225301 / 225201	224501 / 225101	225501 / 225401

Odkážte se na specifickou aplikaci pro použitý analyzátor.

Materiál:

- Spektrofotometr, fotometr nebo automatické přístroje pro chromogenní testy s vlnovou délkou detekce 405 nm.
- Vodní lázeň.
- Kalibrované pipety, stopky.

PŘÍPRAVA PLAZMY A ODBĚR VZORKU:

Krev (9 dílů) by měla být opatrně odebrána do antikoagulantu citrátu tri-sodného (1 díl; 0,109 M, 3,2%) přímou venepunkcí. První zkumavka by měla být znehodnocena.

Příprava a skladování vzorků se provádí dle lokálních doporučení (v USA směrnice CLSI H21-A5)⁵.

Pro informace o skladování plazmy se odkažte na referenci⁷.

PROVEDENÍ TESTU:

Souprava může být použita pro automatizovanou kinetickou metodu nebo manuální (end-point) metodu. Test se provádí při 37°C a výsledek se měří při 405nm.

Aplikační protokoly pro automatizovanou metodu jsou dostupné na vyžádání. Odkažte se na specifický aplikační protokol pro Váš analyzátor.

Stanovení Rivaroxabanu

1. Připravte kalibrátory a kontroly dle doporučení v příbalových letáčích specifických reagentů. Kalibrační plazmy by měly být naředěny pufrům R3 tak, jak je popsáno níže v tabulce.

2. Vzorky, kalibrátory a kontroly by měly být ředěny pufrům R3:

Test	Kat. č. kalibrátorů	Kat. č. kontrol	Ředění v R3 diluentu
Rivaroxaban	222701	224501	1/15
Rivaroxaban Low Range	226001	225101	1/3
Vzorky	-	-	1/15 (standardní rozmezí) 1/3 (nízké rozmezí)

Kalibrujte a proměřte kontroly kvality. Při skladování za pokojové teploty (18-25°C) by ředěné vzorky měly být testovány rychle. Koncentrace každé šarže kalibrátorů a kontrol jsou uvedeny v letáčích, které jsou součástí jejich balení.

3. Postupujte následovně - měření v plastových zkumavkách při 37°C:

Reagencie	Objem
Kalibrátory, testovaná plazma, kontroly ředěné v R3	200 µl
R1:Lidský FXa, přehřátý na 37°C	200 µl
Promíchejte a inkubujte 1 minutu při 37°C, potom pipetujte:	
R2: Substrát přehřátý na 37°C	200 µl
Promíchejte a inkubujte 45 přesně sekund při teplotě 37°C	
Reakci zastavte přidáním:	
Kyselina citronová (2%)*	400 µl
Promíchejte a měřte absorbanci při vlnové délce 405 nm proti slepému vzorku (blank)	

*Nebo kyseliny octové (20%). Výsledné žluté zbarvení je stabilní 2 hodiny. Slepý vzorek (blank) získáte smícháním reagentů obráceným způsobem – t.j. Citronová kyselina (2%) nebo octová kyselina (20%), substrát, FXa(h), ředěný vzorek.

Absorbanci měřte při 405 nm, od získané hodnoty absorbance odečtěte hodnotu absorbance slepého vzorku.

Stanovení Apixabanu (manuální metoda):

1. Připravte kalibrátory dle doporučení v příbalových letáčích specifických kalibrátorů. Ředění kalibrátorů v pufru R3 dle tabulky níže.

2. Vzorky a kontroly by měly být ředěny pufrům R3 tak, jak je popsáno níže:

Test	Kat. číslo kalibrátorů	Kat. číslo kontrol	Ředění v R3 diluentu
Apixaban	226201	225301	1/40
Apixaban Low Range	226101	225201	1/6
Vzorek	-----	-----	1/40 (standardní rozmezí) 1/6 (nízké rozmezí)

Po kalibraci ověřte kontrolami kvality křivku. Při skladování v pokojové teplotě (18-25°C) testujte naředěné vzorky rychle. Přesné hodnoty kalibrátorů a kontrol jsou uvedeny v příloženém letáku.

3. Postupujte následovně – měření v plastových zkumavkách při 37°C:

Reagencie	Objem
Kalibrátory, testovaná plazma, kontroly ředěné v R3	200 µl
R1:Lidský FXa, přehřátý na 37°C	200 µl
Promíchejte a inkubujte 1 minutu při 37°C, potom pipetujte:	
R2: Substrát přehřátý na 37°C	200 µl
Promíchejte a inkubujte 45 přesně sekund při teplotě 37°C	
Reakci zastavte přidáním:	
Kyselina citronová (2%)*	400 µl
Promíchejte a měřte absorbanci při vlnové délce 405 nm proti slepému vzorku (blank)	

*nebo kyselina octová (20%). Žluté zbarvení je stabilní 2 hodiny.

Slepý vzorek (blank) získáte smícháním reagentů obráceným způsobem – t.j.

Citronová kyselina (2%) nebo octová 20%, substrát, FXa(h), ředěný vzorek.

Absorbanci měřte při 405 nm, od získané hodnoty absorbance odečtěte hodnotu absorbance slepého vzorku.

Stanovení Edoxabanu (manuální metoda):

1. Připravte kalibrátory dle doporučení v příbalových letáčích specifických kalibrátorů. Ředění kalibrátorů v pufru R3 dle tabulky níže.

2. Vzorky a kontroly by měly být ředěny pufrům R3 tak, jak je popsáno níže:

Test	Katalog. Číslo Kalibrátor	Katalog. Číslo Kontrola	Ředění v R3 diluentu
Edoxaban	226501	225501	1/15
Edoxaban Low Range	226401	225401	1/4
Vzorky	-	-	1/15 (standardní rozmezí) 1/4 (nízké rozmezí)

Po kalibraci ověřte kontrolami kvality křivku. Při skladování v pokojové teplotě (18-25°C) testujte naředěné vzorky rychle. Přesné hodnoty kalibrátorů a kontrol jsou uvedeny v příloženém letáku.

3. Postupujte následovně – měření v plastových zkumavkách při 37°C:

Reagencie	Objem
Kalibrátory, testovaná plazma, kontroly ředěné v R3	200 µl
R1:Lidský FXa, přehřátý na 37°C	200 µl
Promíchejte a inkubujte 1 minutu při 37°C, potom pipetujte:	
R2: Substrát přehřátý na 37°C	200 µl
Promíchejte a inkubujte 45 přesně sekund při teplotě 37°C	
Reakci zastavte přidáním:	
Kyselina citronová (2%)*	400 µl
Promíchejte a měřte absorbanci při vlnové délce 405 nm proti slepému vzorku (blank)	

*Nebo kyseliny octové (20%). Výsledné žluté zbarvení je stabilní 2 hodiny.

Slepý vzorek (blank) získáte smícháním reagentů obráceným způsobem – t.j. Citronová kyselina (2%) nebo octová kyselina (20%), substrát, FXa(h), ředěný vzorek.

Absorbanci měřte při 405 nm, od získané hodnoty absorbance odečtěte hodnotu absorbance slepého vzorku.

Vytvořte slepý vzorek (blank) pokud je plazma ikerická, lipemická, hemolyzovaná nebo se její barva liší od standardní plazmy.

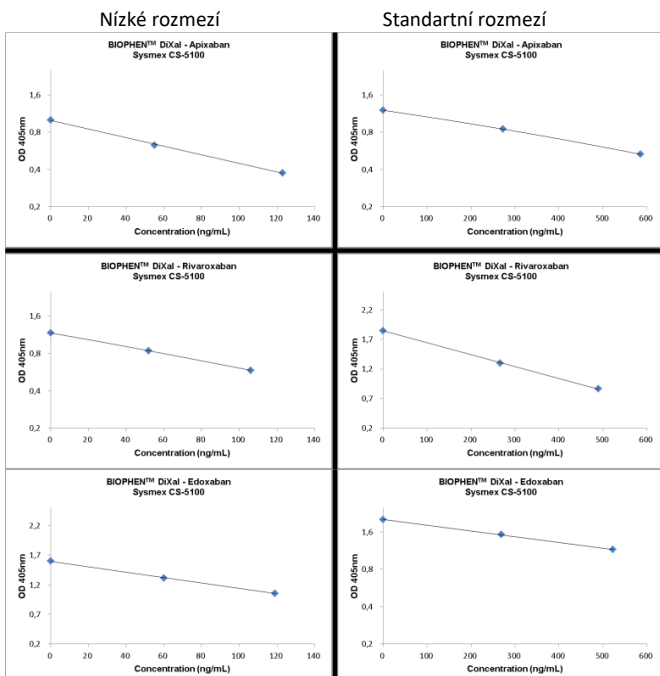
Pro kinetickou metodu používejte ΔOD 405 místo OD 405.

Pokud jsou požadovány vyšší nebo nižší reakční objemy, než jsou uvedené, musí být zachován poměr mezi reagenty – koncentrace i objem. Uživatel je odpovědný za validaci jakýchkoli změn a jejich vlivu na výsledek.

KALIBRACE:

BIOPHEN™ DiXal souprava může být kalibrována pro analýzu různých inhibitorů FXa – Apixabanu, Rivaroxabanu a Edoxabanu. Soupravy kalibrátorů specifických pro tyto analyty, pokrývající testovací rozmezí, jsou dostupné od výrobce Hyphen-BioMed (viz REAGENCIE A MATERIÁL POTŘEBNÝ, V KITU NEPŘÍTOMNÝ a mohou být použity pro kalibrace na testování těchto specifických analytů.

Níže uvedená kalibrační křivka je pouze příklad. Pro měření vždy použijte vlastní kalibraci.



KONTROLA KVALITY:

Použití komerčně dostupného kontrolního materiálu umožní validaci kalibrační křivky, stejně tak i homogenní reaktivity v sérii nebo mezi sériemi testů při použití stejné šarže reagentie.

Pro novou šarži reagentie musí být vytvořena nová kalibrační křivka. Stejně tak po každé významné údržbě nebo opravě analyzátoru, nebo když jsou hodnoty kontrolního materiálu mimo přijatelné rozmezí.

Každá laboratoř musí stanovit vlastní akceptabilní rozmezí dle použitého protokolu a přístroje.

VÝSLEDEK:

- Pro manuální end-point metodu, kalibrační křivka s OD405 nm na ose Y a koncentrace analytu na ose X:
 - Rivaroxaban nízké rozmezí:** použijte **Lin-Log měřítka** (ng/ml – OD)
 - Rivaroxaban standartní rozmezí:** použijte **Lin-Lin měřítka** (ng/ml – OD)
 - Apixaban:** použijte **Lin-Lin měřítka** (ng/ml-OD) pro obě rozmezí
 - Edoxaban nízké rozmezí,** použijte **Lin-Lin měřítka** (ng/ml - OD)
 - Edoxaban standartní rozmezí** použijte **Lin-Log měřítka** (ng/ml - OD)
- Koncentrace DiXal (v **ng/ml**) v testovaném vzorku je přímo odečtena z kalibrační křivky, pokud je použito standardní ředění.
- Výsledky by měly být interpretovány ve shodě s klinickým a biologickým stavem pacienta.

LIMITY:

- Pro zajištění optimálního provedení testu by měly být dodržovány instrukce validované výrobcem HYPHEN BioMed.
- Každá reagentie neobvyklého vzhledu nebo jevící známky kontaminace nesmí být použita.
- Plazma neobvyklého vzhledu nebo jevící známky aktivity musí být znehodnocena.
- Vzorky s vysokou koncentrací analytu mohou být předředeny normální poolovanou plazmou. Naměřená koncentrace pak musí být násobena dodatečným dilučním faktorem.
- V případě, že pacientovi je podáván antiodot andexanet alfa jsou komerčně dostupné reagentie k měření anti-FXa aktivity nevhodné^{8,9}. Během jejich průběhu měření se inhibitor FXa odštěpí od andexanet alfa, což vede k falešně zvýšené anti-FXa aktivitě a tudíž k podcenění účinnosti andexanet alfa. Data měření s BIOPHEN™ DiXal nejsou dostupná.

OČEKÁVANÉ VÝSLEDKY:

Apixaban, Rivaroxaban a Edoxaban se v normální plazmě nenacházejí. Terapeutické rozmezí a rozmezí krvácivého rizika by měly být definovány ve shodě s lokálními doporučeními. Výsledek musí být interpretován společně s posouzením klinického a biologického stavu pacienta.

CHARAKTERISTIKA:

- Mez stanovitelnosti a rozsah měření by měly být definovány pro každý užívaný analytický systém.**
- Pro standardní rozmezí je kalibrační rozmezí od cca **0 do 500 ng/ml Rivaroxabanu / Edoxabanu** a od **0 do 600 ng/ml Apixabanu**.
- Pro nízké rozmezí je kalibrační rozmezí od **0 do 100 ng/ml Rivaroxabanu** a od **0 do 120 ng/ml Apixabanu / Edoxabanu**.
- Příklad reprodukovatelnosti, získaný při použití přístroje Systmex Cs-série, kontrolního materiálu a jedné šarže reagentie. Byly získány následující výsledky:

Měřené rozmezí (ng/ml)	Rivaroxaban				Apixaban			
	0 – 500 ng/ml		0 – 100 ng/ml		0 – 600 ng/ml		0 – 120 ng/ml	
	N	CV%	N	CV%	N	CV%	N	CV%
Intra Assay	30	1,5	30	1,7	30	1,8	30	1,8
Inter Assay	20	2,3	20	2,2	20	3,2	20	2,9
Edoxaban								
Měřené rozmezí (ng/ml)	0 – 500 ng/ml		0 – 120 ng/ml					
	N	CV%	N	CV%				
Intra Assay	40	2,1	40	2,0				
Inter Assay	120	2,7	120	5,1				

- Tento test byl vytvořen tak, aby se vyloučil vliv interference plazmatických faktorů. Je kompletně necitlivý na hepariny v obvyklých koncentracích.**
- Test je specifický, senzitivní a nabízí vysokou flexibilitu pro dynamické rozmezí podle použitého pracovního ředění.
- Test je kalibrován a optimalizován pro Rivaroxaban / Apixaban / Edoxaban. Křivky vytvořené pro Rivaroxaban, Apixaban nebo Edoxaban používají koncentraci v jednotkách ng/ml. Pokud je kalibrace vyjádřena v anti-Xa jednotkách/ml, nebo pokud je testován jiný přímý Xa inhibitor, musí uživatel brát v úvahu specifickou anti-Xa aktivitu použité látky.
- Korelace referenční metody (LCMS :MS proti BIOPHEN™ DiXal Edoxaban):

$$\text{Systmex CS-5100: } n = 142 \quad y = 1,00x + 13,10 \quad r = 0,997$$
 Odkážte se na specifickou aplikaci pro každý analyzátor.
- Interference:** Viz specifická aplikace pro analyzátor.

REFERENCE:

- Weitz JI, *et al.* American College of Chest Physicians. New antithrombotic drugs: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. Chest. 2012.
- Pernod G, *et al.* Management of major bleeding complications and emergency surgery in patients on long-term treatment with direct oral anticoagulants, thrombin or factor-Xa inhibitors. Proposals of the Working Group on Perioperative Haemostasis (GIHP). Ann Fr Anesth Reanim. 2013.
- Douxflis J, *et al.* Comparison of calibrated chromogenic anti-Xa assay and PT tests with LC-MS/MS for the therapeutic monitoring of patients treated with rivaroxaban. Thromb Haemost. 2013.
- Douxflis J, *et al.* Impact of Apixaban on routine and specific coagulation assays: a practical laboratory guide. Thromb Haemost. 2013 June.
- Ruff CT *et al.* Association between edoxaban dose, concentration, anti-Factor Xa activity, and outcomes: an analysis of data from the randomised, double-blind ENGAGE AF-TIMI 48 trial. Lancet. ;385(9984):2288-95. 2015.
- CLSI Document H21-A5 : "Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma -based coagulation assays and molecular hemostasis assays; approved guideline". Fifth Edition, 28, 5, 2008.
- Douxflis J, *et al.* Non-VKA Oral Anticoagulants: Accurate Measurement of Plasma Drug. BioMed Research International. 2015.
- Commercial anti-FXa activity assays are unsuitable for measuring anti-FXa activity following administration of andexanet alfa. European Medicine Agency [Internet]. 2020 Jun [cited 2020 Jun 17]. Available from <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/dhpc/ondexxya-andexanet-lfacommercial-anti-fxa-activity-assays-are-unsuitable-measuring-anti-fxa>
- Tomoda H. *et al.* Andexanet Alfa for Bleeding with Factor Xa Inhibitors. N Engl J Med. 2019.

SYMBOLY:

Použité symboly a znaky jsou v seznamu ISO 15223-1 standard, viz dokument Definice Symbolů.

- R1** H315: Dráždí kůži.
H319: Způsobuje vážné podráždění očí.